



FR 00/623

EJU

BREVET D'INVENTION

REC'D 08 MAY 2000

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

WIPO

PCT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 MARS 2000

**DOCUMENT DE
PRIORITÉ**
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÉGLE
17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

<p>DATE DE REMISE DES PIÈCES 15 mars 99</p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 99 03154</p> <p>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 77</p> <p>DATE DE DÉPÔT 15 MARS 1999</p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>CABINET REGIMBEAU 26, Avenue Kléber 75116 PARIS</p>	
<p>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p><input type="checkbox"/> demande initiale</p> <p><input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°</p> <p>Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non</p> <p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p>UTILISATION DE FRACTIONS MEMBRANAIRES BACTERIENNES A ACTIVITE IMMUNOSTIMULANTE DANS LE TRAITEMENT DE CANCERS, LEURS PROCEDES DE PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT.</p>		<p>n° du pouvoir permanent 237605 D17974 NIP références du correspondant 01 45 00 92 02 téléphone</p> <p>date</p>	
<p>3 DEMANDEUR (S) n° SIREN</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p>PIERRE FABRE MEDICAMENT</p> <p>Nationalité (s) Française</p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p>45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE</p>		<p>code APE-NAF</p> <p>Forme juridique</p> <p>SOCIETE ANONYME</p> <p>REC'D 08 MAY 2000</p> <p>WIPO PCT</p> <p>Pays FR</p>	
<p>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p>			
<p>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission</p>			
<p>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</p> <p>pays d'origine : numéro : date de dépôt : nature de la demande :</p>			
<p>7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° : date : n° : date :</p>			
<p>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)</p> <p>911253</p>		<p>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</p> <p>2</p>	

17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

9903154

TITRE DE L'INVENTION :

**UTILISATION DE FRACTIONS MEMBRANAIRES BACTERIENNES
A ACTIVITE IMMUNOSTIMULANTE DANS LE TRAITEMENT DE CANCERS, LEURS
PROCEDES DE PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES
CONTENANT.**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

**PIERRE FABRE MEDICAMENT
45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE**

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

**LIBON Christine
9, avenue de Ternier
74160 Saint Julien en Genevois
FR**

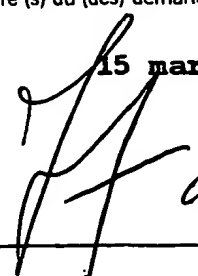
**CORVAIA Nathalie
32, rue des Chênes
74160 Saint Julien en Genevois
FR**

**BECK Alain
503, route du Poirier à l'Ane
74160 Collonges sous Salève,
FR**

**BONNEFOY Jean-Yves
Les Noyers
74350 Le Sappey, FR**

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

15 mars 1999
 9/11/83

CABINET REGIMBEAU

La présente invention a pour objet l'utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment de *Klebsiella pneumoniae* pour la préparation d'une composition pharmaceutique immunostimulante et/ou capable d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale, destinée en particulier au traitement et à la
5 prévention des cancers. L'invention comprend en outre des procédés de préparation desdites fractions membranaires ainsi que des compositions pharmaceutiques les contenant, notamment associées à des composés anti-cancéreux.

La transformation d'une cellule normale en cellule maligne est le résultat de nombreux événements différents, qui peuvent se produire spontanément, comme les
10 mutations ou les réarrangements de gènes, ou être induits par des agents chimiques, physiques ou viraux.

Les tumeurs sont infiltrées par des cellules immunocompétentes, notamment des lymphocytes, des cellules dendritiques et des macrophages.

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) proviennent de la circulation sanguine et sont recrutés sur le site tumoral par des cytokines. Les TAM se lient aux
15 cellules tumorales par l'intermédiaire de glycoprotéines, sucres et phospholipides, et prolifèrent au site tumoral (J. Natl. Cancer Inst., 1998, 90:1583). Ils y sécrètent de nombreuses cytokines qui participent à leur activité anti-tumorale. Parmi les plus importantes, on trouve le TNF- α et l'IL-12.

20 L'activité anti-tumorale du TNF- α a été démontrée dans des modèles expérimentaux chez la souris (Beyaert R. and Fiers W., Cytokines, chapter 24, 335-360 Academic Press 1998) et a été testée chez l'homme pour traiter les cancers de la vessie : seul, il présente une activité modérée (Steinberg et al., Ann. Oncol., 1992, 3,741-745 ; Eur Urol 1992, 22:112).

25 La production d'IL-12 par des macrophages activés sert à moduler la réponse immunitaire en favorisant la formation de lymphocytes T CD4+ de type Th1, qui produisent de l'IL-2 et de l'IFN- γ . L'activité inhibitrice de l'IL-12 sur l'angiogenèse et la régression tumorale est bien connue, et semble liée à l'induction d'IFN- γ qui stimule la production d'IP-10 (interferon-inducible protein-10) et de MIG (monokine
30 induced by IFN- γ) (J. Natl. Cancer Inst., 1998, 90:1583).

La thérapie à BCG (Bacille Calmette Guérin) est utilisée pour prévenir la récurrence de certains types de cancer de la vessie. Le mécanisme d'action proposé actuellement repose sur la production de cytokines : libération précoce de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8), dans un deuxième temps production d'IL-2 et d'IFN- γ (réponse Th1), puis plus tardivement d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10 (réponse Th2). Enfin, se produit une phase d'activation cellulaire avec amplification de populations cytotoxiques (Patard et al., Progrès en Urologie, 1998, 8,415-421).

Cependant, la thérapie à BCG n'a pas que des avantages, car l'efficacité parfois observée l'est au prix d'une morbidité également supérieure. De plus, il existe des contre-indications à la BCG thérapie : tuberculose active (mais pas tuberculose antérieure), immunosuppression (HIV, transplantation, ...), réaction systémique antérieure au BCG (hépatite, pneumonie, BCGite), traitements aux stéroïdes. Par ailleurs, il existe des résistances ou des récurrences après une thérapie à BCG.

La fraction membranaire de *K. pneumoniae* I145 entre dans la composition d'une préparation pharmaceutique prévenant la survenue et la récurrence d'infections respiratoires d'origine bactérienne et utilisée chez l'homme depuis 20 ans. A ce titre, il existe un recul de non toxicité du produit. L'ensemble des données citées plus haut montre qu'il existe aujourd'hui un besoin de disposer de nouveaux immunostimulants dépourvus d'activité toxique. De tels immunostimulants seraient d'un grand intérêt pour le traitement de certains types de cancer.

De manière surprenante, les auteurs de la présente invention ont mis en évidence que des fractions membranaires d'une bactérie à gram négatif, notamment *Klebsiella pneumoniae* (dénommée FMKp), en particulier des fractions membranaires obtenues par les procédés tels que décrits ci-après dans les exemples, possèdent les propriétés immunostimulantes recherchées.

Les inventeurs ont montré de manière inattendue que la FMKp ou l'un de ses constituants majeurs, la protéine de membrane externe OmpA, dénommée P40 (telle que décrite dans les demandes de brevets WO 95/27787 et WO 96/14415) était capable non seulement de stimuler la prolifération des cellules mononucléées du sang humain, démontrant ainsi son activité immunostimulante, mais également d'induire la

production de TNF- α et d'IL-12, notamment par les monocytes, cytokines impliquées dans la réponse immunitaire anti-tumorale.

Ainsi, la présente invention a pour objet l'utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment de *Klebsiella pneumoniae*,
5 comme composé immunostimulant et/ou capable d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale, ou pour la préparation d'une composition pharmaceutique immuno-stimulante, et/ou capable d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale, et ce quel que soit le mode d'administration in vivo choisi (voie entérale ou parentérale).

Par composé ou composition pharmaceutique immunostimulante, on entend
10 désigner dans la présente invention un composé ou une composition pharmaceutique capable d'augmenter une réponse immune non spécifique.

Par composé ou composition pharmaceutique capable d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale, on entend désigner dans la présente invention un composé ou une composition pharmaceutique capable en particulier d'accroître l'efficacité d'un
15 composé anti-cancéreux ou d'accroître l'efficacité d'un traitement anti-cancéreux, tel que par exemple un traitement par radiothérapie.

L'invention concerne également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la fraction membranaire comprend au moins des fractions membranaires de deux souches différentes de bactéries.

20 Par fraction membranaire de bactérie, on entend désigner dans la présente invention toute fraction ou extrait membranaire purifié ou partiellement purifié obtenu à partir d'une culture de ladite bactérie et dont le procédé de préparation comprend au moins une étape de lyse des bactéries obtenues après culture et une étape de séparation de la fraction contenant les membranes desdites bactéries du lysat total obtenu après
25 l'étape de lyse, notamment par centrifugation ou filtration.

Par fraction membranaire de bactérie lorsque ladite bactérie est *Klebsiella pneumoniae*, on entend désigner également dans la présente invention la protéine P40, fraction active de la fraction membranaire de *Klebsiella pneumoniae*, de séquence d'acides aminés SEQ ID N° 2, ou l'un de ses fragments.

Selon l'invention, les fractions membranaires pourront être préparées selon les méthodes connues de l'homme de l'art telles que par exemple la méthode décrite par Hacuw J.F. et al. (Eur. J. Biochem, 255, 446-454, 1998).

Selon un mode de réalisation particulier, l'invention est relative à une utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction ;
- d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéolytiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- f) ultra-sonication du culot obtenu à l'étape e).

L'étape b) de désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a) peut être réalisée par toutes méthodes connues de désactivation d'enzymes, telles qu'en particulier par chauffage du culot bactérien remis en suspension à une température de préférence voisine de 100°C, ou par addition d'inhibiteur de l'activité de ces enzymes.

L'étape c) d'extraction et d'élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) peut être réalisée par exemple par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction correspondant à l'addition d'une solution hypertonique (solution d'extraction), de préférence une solution saline de molarité voisine de 1 M, suivie après un temps de contact suffisant pour l'effet désiré d'une centrifugation de la suspension obtenue et de l'élimination du surnageant obtenu après ladite centrifugation, ce cycle de lavage pouvant être reproduit plusieurs fois.

L'étape d) de digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) peut être réalisée en présence d'une solution d'enzymes protéolytiques telles que par exemple la trypsine, la chymiotrypsine ou toute enzyme à activité protéolytique connue, les conditions de la réaction, pH de la solution, température et durée de la réaction, étant de préférence ajustées aux conditions optimales pour l'activité de ou des enzymes choisies, suivie d'une centrifugation, ce cycle de digestion pouvant être reproduit plusieurs fois avec la même enzyme, la même combinaison d'enzymes ou avec une enzyme différente pour chaque cycle de digestion effectué.

L'étape e) de lavage du culot obtenu à l'étape d) est réalisée par reprise du culot en dans une solution physiologique ou dans de l'eau distillée suivie, après un temps de contact suffisant, d'une centrifugation, ce cycle de lavage pouvant être reproduit plusieurs fois.

Enfin, l'étape f) d'ultra-sonication du culot a pour objectif en particulier de désintégrer et d'homogénéiser la fraction membranaire obtenue en fin d'étape e). Les conditions d'ultra-sonication (durée et puissance) seront déterminées par l'homme de l'art en fonction par exemple de la quantité de fraction membranaire à traiter.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'invention est relative à une utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une décongélation et du séchage des cellules ;
- c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du culot ;
- f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et

g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).

Les conditions de décongélation à l'étape b) du procédé ci-dessous seront bien entendu déterminées par l'homme de l'art en fonction de la quantité de culot initiale à traiter, de préférence réalisée à 4°C pendant au moins 48 heures pour l'équivalent de
5 1 Kg de cellules sèches.

A l'étape c), l'élimination des acides nucléiques est réalisée par exemple par l'addition d'une DNase, à une concentration finale de 5 mg/ml d'une suspension de cellules à une concentration équivalente à 5 % de cellules sèches.

Le broyage des cellules obtenues à l'étape c) peut être réalisé au moyen de tout
10 système ou appareillage connu par l'homme de l'art pour le broyage de cellules tel que les presses ou de préférence tel que le broyage en boucle de Manton Gaulinet pendant 30 minutes.

La clarification de la suspension obtenue après broyage pourra être réalisée au moyen de tout système ou appareillage connu par l'homme de l'art pour la
15 clarification de broyats cellulaires bactériens tel que le système Sharpless.

L'étape e) de précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) peut être réalisée par exemple avec l'acide acétique. La précipitation est suivie par l'élimination du culot au moyen par exemple d'un système de type Sharpless et par la récupération du surnageant.

20 L'étape f) consiste en une étape dans laquelle le surnageant, obtenu après précipitation en milieu acide, est neutralisé, dilué, dialysé puis concentré.

Enfin, la dernière étape consiste en une étape de stérilisation du concentré de fraction membranaire obtenu à l'étape précédente comme par exemple par chauffage à 121°C pendant environ 35 minutes.

25 L'invention concerne de manière particulière l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la fraction membranaire est la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* de séquence SEQ ID N° 2, ou l'un de ses fragments.

Par fragment de la protéine P40, on entend désigner en particulier tout fragment de séquence d'acides aminés compris dans la séquence d'acides aminés de la
30 protéine p40 capable d'augmenter une réponse immune non spécifique et/ou capable d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale, et comprenant au moins 5 acides

aminés, de préférence au moins 10 acides aminés ou de manière plus préférée au moins 15 acides aminés.

Bien entendu, ladite protéine P40, ou ses fragments, pourront être obtenus par synthèse chimique ou sous forme de peptides recombinant.

5 Les méthodes de préparation de peptides recombinants sont aujourd'hui bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description. Parmi les cellules utilisables pour la production de ces peptides recombinants, il faut citer bien entendu les cellules bactériennes (Olins P.O. et Lee S.C., 1993, Recent
10 advances in heterologous gene expression in E. coli. Curr. Op. Biotechnology 4:520-525), mais également les cellules de levure (Buckholz R.G., 1993, Yeast Systems for the Expression of Heterologous Gene Products. Curr. Op. Biotechnology 4:538-542), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards C.P. et Aruffo A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4, 558-563) mais
15 également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre par exemple des baculovirus (Luckow V.A., 1993, Baculovirus systems for the expression of human gene products. Curr. Op. Biotechnology 4, 564-572).

L'invention a également pour objet l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de
20 véhiculer ladite fraction membranaire sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son activité immunostimulante et/ou sa capacité à induire une réponse immunitaire anti-tumorale, telle que sous la forme d'une émulsion de type huile dans eau ou eau dans huile, ou sous la forme d'une particule de type liposome, microsphère, nanosphère ou tout type de structure permettant l'encapsulation et la
25 présentation sous forme particulière de ladite fraction membranaire.

Est également comprise dans la présente invention, l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire anti-tumorale desdites fractions membranaires.

Parmi lesdits agents permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire anti-tumorale desdites fractions membranaires, on préfère les cytokines et les composés cellulaires.

Parmi les cytokines, on peut citer, mais sans s'y limiter : l'IL-2, l'IL-12, l'IL-18, l'IFN- γ et l'IFN- α .

Parmi les composés cellulaires, on préfère notamment les acides nucléiques, les composés de la famille des ribosomes, ou encore les protéines de la famille des protéines de choc thermique.

Est également comprise dans la présente invention, l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent potentialisateur permettant de réguler l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire anti-tumorale desdites fractions membranaires.

Parmi lesdits agents potentialisateurs permettant de réguler l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire anti-tumorale desdites fractions membranaires, on préfère les hormones et les facteurs de croissance.

Parmi les hormones, on peut citer, mais sans s'y limiter la β -hCG.

Parmi les facteurs de croissance, on peut citer, mais sans s'y limiter : l'EGF, l'IGF-1, l'IGF-2, le GM-CSF et le G-CSF.

L'invention a également pour objet l'utilisation selon l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée en association avec un traitement anti-cancéreux, notamment un traitement anti-cancéreux par chimiothérapie (mono ou polychimiothérapie) et/ou une radiothérapie.

Selon l'invention, la préparation de la composition pharmaceutique est destinée à être administrée, par voie entérale ou parentérale, simultanément, séparément ou étalée dans le temps avec le traitement anti-cancéreux.

L'invention comprend en outre l'utilisation selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique comprenant un composé à activité anti-cancéreuse associé à ladite fraction membranaire.

De nombreux composés à activité anti-cancéreuse peuvent être ainsi associés à ladite fraction membranaire immunostimulante et/ou capable d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale.

Parmi ces composés, on peut citer notamment, mais sans s'y limiter, les inhibiteurs de protéases ou les composés à activité anti-angiogénique, tels que par exemple :

- les inhibiteurs de protéases tels que les TIMPs ;
- 5 ou les composés à activité anti-angiogénique suivants : l'angiostatine, l'endostatine, MCP-1, IP-10 et PF-4 ainsi que des anticorps, des antisens ou des peptides anti-VEGF, anti-angiogénine, anti-aFGF, anti-bFGF.

Ainsi, l'invention est relative à l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit traitement anti-cancéreux associé est un traitement chimiothérapeutique
10 comprenant un inhibiteur de protéases ou un composé à activité anti-angiogénique.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou le traitement des cancers, notamment les cancers de la vessie, de la prostate, du colon, du foie, ou les mélanomes malins.

15 Sous un autre aspect, l'invention est relative à un procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment *Klebsiella pneumoniae*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- 20 b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction ;
- 25 d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéasiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- f) ultra-sonication du culot obtenu à l'étape e).

L'invention comprend aussi le procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment *Klebsiella pneumoniae*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance
5 suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une décongélation et du séchage des cellules ;
- c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches
obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- 10 d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du culot ;
- f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension
membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension
15 membranaire ; et
- g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).

Les fractions membranaires susceptibles d'être obtenues par lesdits procédés font bien entendu partie de l'invention.

Le titre en protéoglycane des fractions membranaires susceptibles d'être
20 obtenues par lesdits procédés, principe actif de la FMKp, représenté par la somme des teneurs en galactose et en protéine, est de préférence compris :

- pour le galactose : entre 1,2 g/l et 3,4 g/l ;
- pour les protéines : entre 7,5 g/l et 14,9 g/l.

De manière plus préférée, ce titre sera :

- 25 - pour le galactose : entre 1,8 g/l et 2,6 g/l ;
- pour les protéines : entre 9,3 g/l et 11,7 g/l.

L'invention concerne en outre les compositions pharmaceutiques comprenant une fraction membranaire susceptible d'être obtenue par les procédés selon l'invention.

30 Sont également comprises dans la présente invention, les compositions pharmaceutiques comprenant une fraction membranaire de bactérie gram négatif,

notamment de *Klebsiella pneumoniae*, caractérisée en ce qu'elle est associée à un traitement anti-cancéreux par chimiothérapie et/ou par radiothérapie.

On entend ici désigner par fraction membranaire, toute fraction membranaire de bactérie gram négatif telle que définie précédemment, dont celle susceptible d'être
 5 obtenue par les procédés selon l'invention et la protéine P40 ou l'un de ses fragments.

De façon préférée, l'invention concerne une composition pharmaceutique selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle contient un composé anti-cancéreux comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, notamment un composé anti-cancéreux choisi parmi les inhibiteurs de protéases
 10 ou parmi les composés présentant une activité anti-angiogénique.

De préférence, lesdites compositions pharmaceutiques selon l'invention, pourront comprendre en outre des agents tels que les véhicules, agents capables de potentialiser et/ou de réguler l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire anti-tumorale desdites fractions membranaires tels que définis précédemment.

15

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Légendes des figures :

Figure 1 : Prolifération de PBMC en présence de FMKp – Etude dose-réponse

20 Les cellules monoclées (PBMC) sont obtenues par séparation à l'aide d'une solution de Ficoll-sodium métrizoate à partir du sang total. Les PBMC sont alorsensemencés à raison de 10 000 cellules/puits en présence d'agents stimulants, sous un volume total de 200 μ l. Après 72 h d'incubation, la prolifération est objectivée par addition de thymidine tritiée. Les résultats sont exprimés en index de stimulation =
 25 [cpm PBMC + stimulus]/[cpm PBMC sans stimulus (= milieu RPMI + 10 % SVF)].

Figure 2 : Prolifération de PBMC en présence de FMKp - Reproductibilité de l'effet sur plusieurs donneurs (FMKp à 250 μ g/ml).

Figure 3 : Production de TNF- α par des monocytes sanguins

30 Les monocytes sont cultivées en milieu RPMI 1640+SVF 10 % et en présence de différentes concentrations de produit. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Conditions de cultures : 200 000

cellules/puits, 18 h d'incubation. Après incubation, les plaques de culture sont centrifugées et les surnageants sont aliquotés et conservés à - 80°C jusqu'au dosage. Les concentrations de cytokines présentes dans les surnageants de cultures sont déterminées par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) : kit Predicta de Genzyme (seuil de détection à 3 pg/ml).

Figure 4 : Production d'IL-12 p70 (biologiquement active) par des monocytes sanguins.

Les monocytes sont cultivées en milieu RPMI 1640+SVF 10 % et en présence de différentes concentrations de produit. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Conditions de cultures : 500 000 cellules/puits, 24 h d'incubation. Après incubation, les plaques de culture sont centrifugées et les surnageants sont aliquotés et conservés à - 80°C jusqu'au dosage. Les concentrations de cytokines présentes dans les surnageants de cultures sont déterminées par ELISA : couple d'anticorps Endogen (seuil de détection à 15 pg/ml).

Exemple 1 : Obtention de la faction membranaire de *K. pneumoniae* (FMKp)

Procédé N° 1

L'extraction des membranes de *K. pneumoniae* I145 à partir du culot de centrifugation de l'étape est précédée de préférence par une étape de destruction des enzymes lytiques des composants cellulaires contenus dans le culot, par exemple par chauffage à 100°C de celui-ci, éventuellement après remise en solution.

L'extraction proprement dite des membranes à partir du culot de centrifugation est réalisée de préférence par traitement des composants cellulaires du culot, après une éventuelle destruction des enzymes lytiques, à l'aide d'une solution saline, par exemple du chlorure de sodium 1 M, une ou plusieurs fois, puis centrifugation, de préférence, à 20 000 g, de la suspension obtenue, le surnageant de cette centrifugation, qui est éliminé, contient les impuretés non membranaires telles que protéines et acides nucléiques, tandis que le culot contient les membranes.

Après séparation de la solution saline contenant les impuretés, les membranes sont digérées en présence d'enzymes protéolytiques, de préférence la trypsine et la chymotrypsine, en solution à pH 8 à 37°C pendant 4 heures.

Après digestion, la solution est homogénéisée par ultra-sonication. Le produit ainsi obtenu constitue la fraction membranaire nommée FMKp.

Le surnageant obtenu est à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions, de préférence à 140 000 g.

5 Préparation des glycopeptides membranaires

Cette fraction est préparée à partir du culot obtenu par centrifugation à 40 000 g pendant 20 minutes. Ledit culot est remis en suspension dans du sérum physiologique puis cette suspension est portée pendant 10 minutes à 100°C dans un bain-marie d'eau bouillante pour désactiver les enzymes lytiques. Après
10 refroidissement, on centrifuge 30 mn à 20 000 g. Le culot obtenu est extrait deux fois avec du NaCl 1M pour éliminer les protéines et les acides nucléiques. Les membranes sont recueillies par centrifugation durant 30 minutes à 20 000 g.

Elles sont ensuite soumises à une digestion par de la trypsine à pH 8 et à 37°C pendant 4 heures puis par de la chymotrypsine dans les mêmes conditions.

15 Les membranes sont alors recueillies par centrifugation à 2 000 g pendant 30 minutes, lavées avec du sérum physiologique puis de l'eau distillée et sont soumises à une désintégration par les ultrasons de 15 minutes.

Procédé N° 2

Après décongélation à + 4°C pendant 48 h minimum, 1 kg de cellules sèches
20 de *K. pneumoniae* est remis en suspension à 5 % cellules sèches. La DNase est ajoutée à 5 mg/l. On procède ensuite au broyage en boucle au Manton Gaulin pendant 30 min puis à une clarification sur SHARPLES à 50 l/h, suivie d'une précipitation à l'acide acétique à pH = 4,2 + 0,1 pendant 30 min. Le culot est éliminé (SHARPLES à 25 l/h) et le surnageant est neutralisé, dilué à 2 fois le volume initial avec de l'eau
25 osmosée. Une dialyse à volume constant est alors effectuée sur PUF 100 jusqu'à 800 Ωcm, suivie d'une concentration de la suspension membranaire (SM) ainsi obtenue, à 11 l/kg de cellules sèches. On procède alors à l'autoclavage de la SM à + 121°C durant 35 min que l'on peut conserver à + 4°C pendant 6 semaines.

Caractéristiques de la FMKp

30 Par définition, le titre en protéoglycane, principe actif de la FMKp, est égal à la somme des teneurs en galactose et en protéines.

- Galactose : en moyenne 2,2 g /l
- Protéines : en moyenne 10,5 g/l

Exemple 2 : Prolifération de PBMC du sang humain

5 Les résultats obtenus montrent que, de manière surprenante, la FMKp déclenche la prolifération de PBMC. Cet effet est dose-dépendant et maximal pour 2,5 mg/ml de FMKp (figure 1). Par ailleurs, cet effet est reproductible (figure 2).

Exemple 3 : Production de cytokines par des monocytes purifiés du sang humain

10 Les monocytes humains sont obtenus à partir des cellules mononucléées (lymphocytes, monocytes, cellules NK, ...) préalablement isolées du sang total humain. L'obtention des monocytes repose sur l'expression en grande quantité de l'antigène de surface CD14 sur ces cellules. La séparation est une sélection positive. L'efficacité de la séparation magnétique des monocytes est ensuite évaluée par
15 cytométrie en flux en effectuant un marquage avec un anticorps CD13 couplé à la fluorescéine iso-thiocyanate (FITC) : la suspension cellulaire contient alors 94 à 97 % de monocytes.

Les résultats d'études in vitro démontrent que, de manière intéressante, la FMKp est un immunostimulant qui induit la prolifération de PBMC du sang humain
20 avec un effet direct sur les monocytes : production de TNF- α (figure 3), et d'IL-12 p70 (figure 4). Il est remarquable que la protéine P40 recombinante (rP40), l'OmpA de *K. pneumoniae*, est également capable de stimuler la production de TNF- α (figure 3), et d'IL-12 p70 (figure 4) par des monocytes humains.

LISTAGE DE SEQUENCE

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
 <120> UTILISATION DE FRACTIONS MEMBRANAIRES BACTERIENNES A
 5 ACTIVITE IMMUNOSTIMULANTE DANS LE TRAITEMENT DE
 CANCERS, LEURS PROCEDES DE PREPARATION ET LES
 COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT.
 <130> D17974
 <140>
 10 <141>
 <160> 2
 <170> PatentIn Vers. 2.0
 <210> 1
 <211> 1035
 15 <212> ADN
 <213> Klebsiella pneumoniae
 <220>
 <221> exon
 <222> (1)..(1032)
 20 <220>
 <221> intron
 <222> (1033)..(1035)
 <220>
 <221> CDS
 25 <222> (1)..(1032)
 <400> 1
 atg aaa gca att ttc gta ctg aat gcg gct ccg aaa gat aac acc tgg 48
 Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp
 1 5 10 15
 30 tat gca ggt ggt aaa ctg ggt tgg tcc cag tat cac gac acc ggt ttc 96
 Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe
 20 25 30
 tac ggt aac ggt ttc cag aac aac aac ggt ccg acc cgt aac gat cag 144
 Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln
 35 35 40 45
 ctt ggt gct ggt gcg ttc ggt ggt tac cag gtt aac ccg tac ctc ggt 192
 Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly
 50 55 60
 ttc gaa atg ggt tat gac tgg ctg ggc cgt atg gca tat aaa ggc agc 240

	Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	
	65						70					75				80	
	ggt	gac	aac	ggt	gct	ttc	aaa	gct	cag	ggc	ggt	cag	ctg	acc	gct	aaa	288
	Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	
5							85					90				95	
	ctg	ggt	tac	ccg	atc	act	gac	gat	ctg	gac	atc	tac	acc	cgt	ctg	ggc	336
	Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Arg	Leu	Gly	
							100					105				110	
	ggc	atg	ggt	tgg	cgc	gct	gac	tcc	aaa	ggc	aac	tac	gct	tct	acc	ggc	384
10	Gly	Met	Val	Trp	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gly	
							115					120				125	
	ggt	tcc	cgt	agc	gaa	cac	gac	act	ggc	ggt	tcc	cca	gta	ttt	gct	ggc	432
	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	His	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Pro	Val	Phe	Ala	Gly	
							130					135				140	
15	ggc	gta	gag	tgg	gct	ggt	act	cgt	gac	atc	gct	acc	cgt	ctg	gaa	tac	480
	Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Thr	Arg	Asp	Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Glu	Tyr	
							145					150				155	
	cag	tgg	ggt	aac	aac	atc	ggc	gac	gcg	ggc	act	gtg	ggt	acc	cgt	cct	528
	Gln	Trp	Val	Asn	Asn	Ile	Gly	Asp	Ala	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Arg	Pro	
20							165					170				175	
	gat	aac	ggc	atg	ctg	agc	ctg	ggc	ggt	tcc	tac	cgc	ttc	ggt	cag	gaa	576
	Asp	Asn	Gly	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Tyr	Arg	Phe	Gly	Gln	Glu	
							180					185				190	
	gat	gct	gca	ccg	ggt	ggt	gct	ccg	gct	ccg	gct	ccg	gct	ccg	gaa	gtg	624
25	Asp	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	
							195					200				205	
	gct	acc	aag	cac	ttc	acc	ctg	aag	tct	gac	ggt	ctg	ttc	aac	ttc	aac	672
	Ala	Thr	Lys	His	Phe	Thr	Leu	Lys	Ser	Asp	Val	Leu	Phe	Asn	Phe	Asn	
							210					215				220	
30	aaa	gct	acc	ctg	aaa	ccg	gaa	ggt	cag	cag	gct	ctg	gat	cag	ctg	tac	720
	Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Gln	Gln	Ala	Leu	Asp	Gln	Leu	Tyr	
							225					230				235	
	act	cag	ctg	agc	aac	atg	gat	ccg	aaa	gac	ggt	tcc	gct	ggt	ggt	ctg	768
	Thr	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Asp	Pro	Lys	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Leu	
35							245					250				255	
	ggc	tac	acc	gac	cgc	atc	ggt	tcc	gaa	gct	tac	aac	cag	cag	ctg	tct	816
	Gly	Tyr	Thr	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Glu	Ala	Tyr	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser	
</																	

Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile
 275 280 285
 ccg gct ggc aaa atc tcc gct cgc ggc atg ggt gaa tcc aac ccg gtt 912
 Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val
 5 290 295 300
 act ggc aac acc tgt gac aac gtg aaa gct cgc gct gcc ctg atc gat 960
 Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp
 305 310 315 320
 tgc ctg gct ccg gat cgt cgt gta gag atc gaa gtt aaa ggc tac aaa 1008
 10 Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys
 325 330 335
 gaa gtt gta act cag ccg gcg ggt taa 1035
 Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly
 340
 15
 <210> 2
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> *Klebsiella pneumoniae*
 20
 <400> 2
 Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp
 1 5 10 15
 Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe
 25 20 25 30
 Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln
 35 40 45
 Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly
 50 55 60
 30 Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser
 65 70 75 80
 Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys
 85 90 95
 Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly
 35 100 105 110
 Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly
 115 120 125
 Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly
 130 135 140

Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr
 145 150 155 160
 Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro
 165 170 175
 5 Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu
 180 185 190
 Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val
 195 200 205
 Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn
 10 210 215 220
 Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr
 225 230 235 240
 Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu
 245 250 255
 15 Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser
 260 265 270
 Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile
 275 280 285
 Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val
 20 290 295 300
 Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp
 305 310 315 320
 Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys
 325 330 335
 25 Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly
 340

REVENDEICATIONS

1/ Utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif pour la préparation d'une composition pharmaceutique immunostimulante, et/ou capable d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale.

2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la fraction membranaire comprend une fraction membranaire de *Klebsiella pneumoniae*.

3/ Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la fraction membranaire comprend au moins des fractions membranaires de deux souches différentes de bactéries.

4/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction ;
- d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéasiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- f) ultra-sonication du culot obtenu à l'étape e).

5/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une décongélation et du séchage des cellules ;

- c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du culot ;
- f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et
- g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).

10 6/ Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que la fraction membranaire est la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* de séquence SEQ ID N° 2, ou l'un de ses fragments.

15 7/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de véhiculer ladite fraction membranaire sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son activité immunostimulante et/ou sa capacité d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale.

 8/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit agent est de type émulsion huile dans eau ou eau dans huile.

20 9/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit agent ou sous la forme d'une particule de type liposome, microsphère, nanosphère ou tout type de structure permettant l'encapsulation et la présentation sous forme particulière de ladite fraction membranaire.

25 10/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire anti-tumorale desdites fractions membranaires.

30 11/ Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire anti-tumorale desdites fractions membranaires est une cytokine.

12/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire anti-tumorale desdites fractions membranaires est un agent de régulation choisi parmi les hormones.

5 13/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire anti-tumorale desdites fractions membranaires est un agent de régulation choisi parmi les facteurs de croissance.

10 14/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire anti-tumorale desdites fractions membranaires est un composé cellulaire.

15/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est un acide nucléique choisi parmi les ADN et les ARN.

15 16/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est un composé de la famille des ribosomes.

17/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est une protéine de la famille des protéines de choc thermique.

18/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 17 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée en association avec un traitement anti-cancéreux.

19/ Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que le traitement anti-cancéreux est une chimiothérapie et/ou une radiothérapie.

20/ Utilisation selon l'une des revendications 18 à 19 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée simultanément, séparément ou étalée dans le temps avec le traitement anti-cancéreux.

21/ Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est administrée par voie entérale ou parentérale.

22/ Utilisation selon l'une des revendications 18 à 21, caractérisée en ce que ledit traitement anti-cancéreux associé est un traitement chimiothérapeutique comprenant un inhibiteur de protéases ou un composé à activité anti-angiogénique.

23/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 23, pour la prévention et/ou le traitement des cancers.

24/ Utilisation selon la revendication 23, pour la prévention et/ou le traitement des cancers de la vessie, de la prostate, du colon, du foie et des mélanomes malins.

25/ Procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- 10 b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction ;
- 15 d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéasiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- f) ultra-sonication du culot obtenu à l'étape e).

26/ Procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une
- 25 décongélation et du séchage des cellules ;
- c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du
- 30 culot ;

f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et

g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).

5 27/ Procédé selon la revendication 25 ou 26, caractérisé en ce ladite bactérie à gram négatif est *Klebsiella pneumoniae*.

28/ Fraction membranaire susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des revendications 25 à 27.

10 29/ Composition pharmaceutique comprenant une fraction membranaire selon la revendication 28.

30/ Composition pharmaceutique comprenant une fraction membranaire de bactérie gram négatif, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, ou composition pharmaceutique selon la revendication 29, caractérisée en ce qu'elle est associée à un traitement anti-cancéreux par chimiothérapie et/ou par radiothérapie.

15 31/ Composition pharmaceutique selon la revendication 30, caractérisée en ce qu'elle contient un composé anti-cancéreux comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

20 32/ Composition pharmaceutique selon la revendication 30, caractérisée en ce que ledit composé anti-cancéreux est choisi parmi les inhibiteurs de protéases ou parmi les composés présentant une activité anti-angiogénique.

ORIGINAL

CABINET REGIMBEAU
CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

1/2

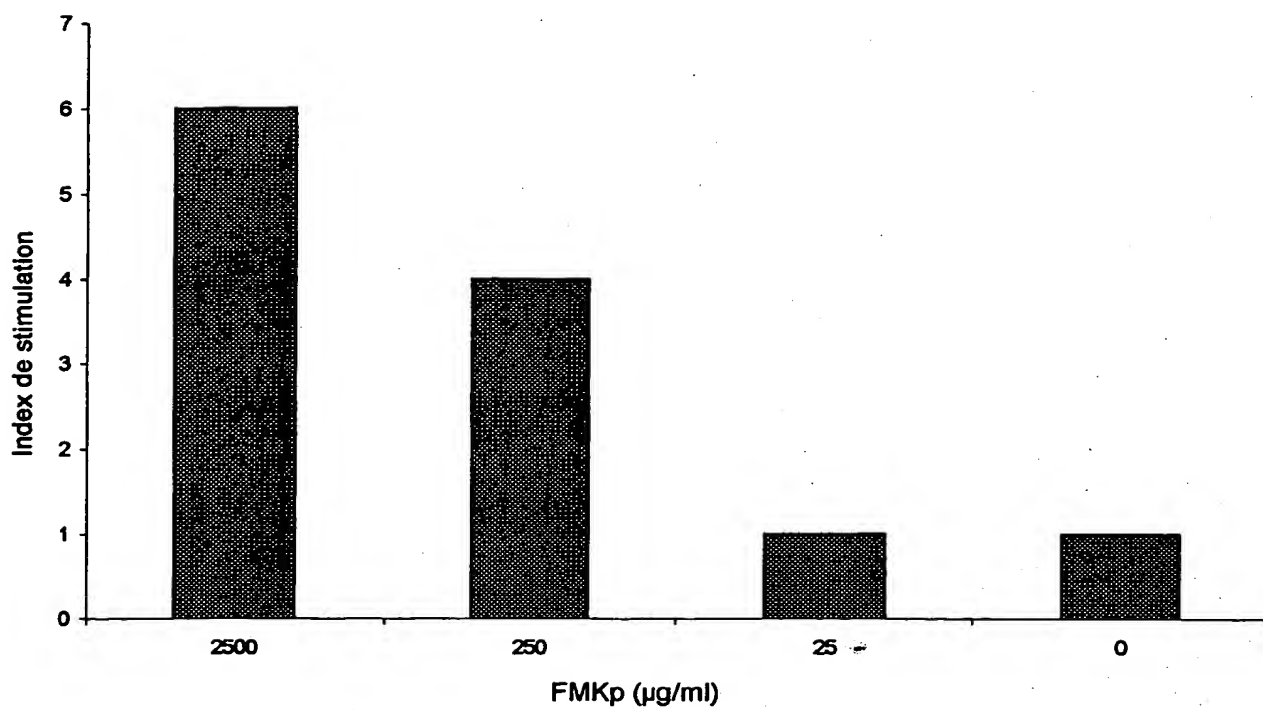


FIGURE 1

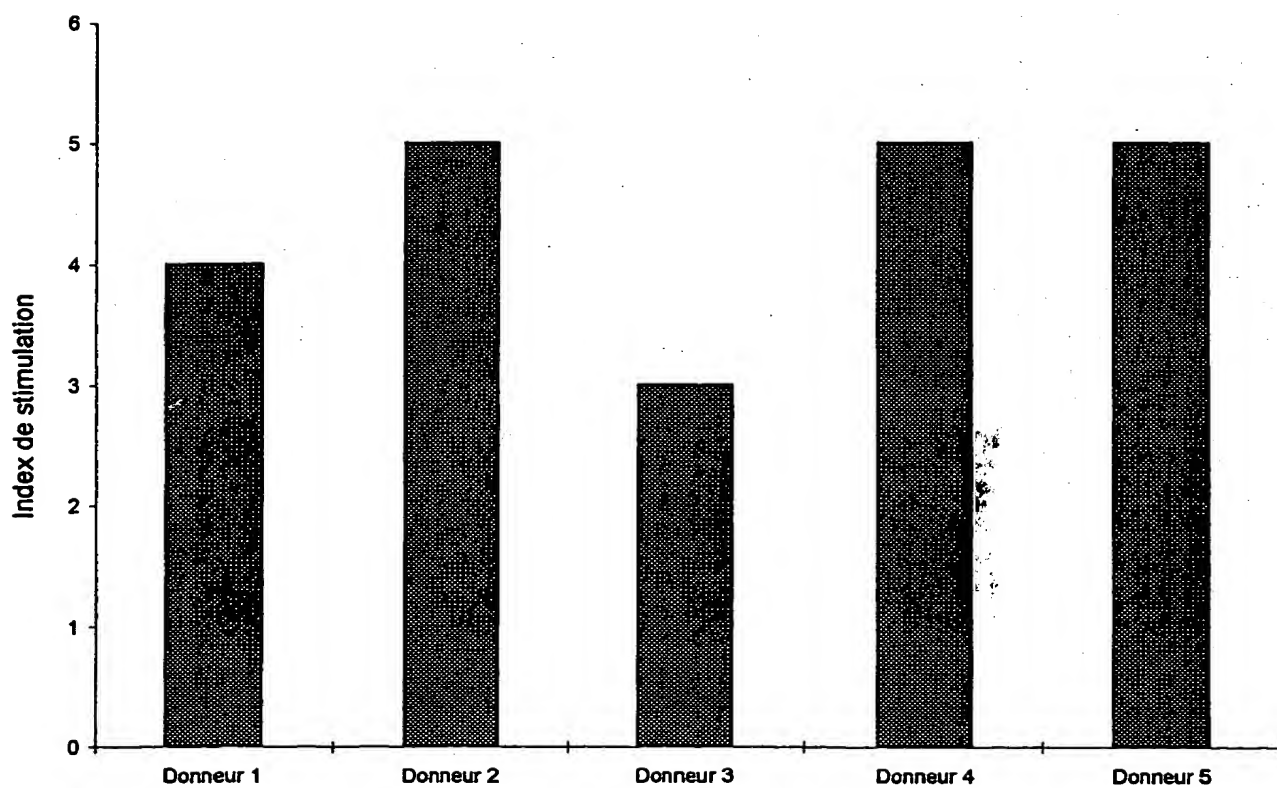


FIGURE 2

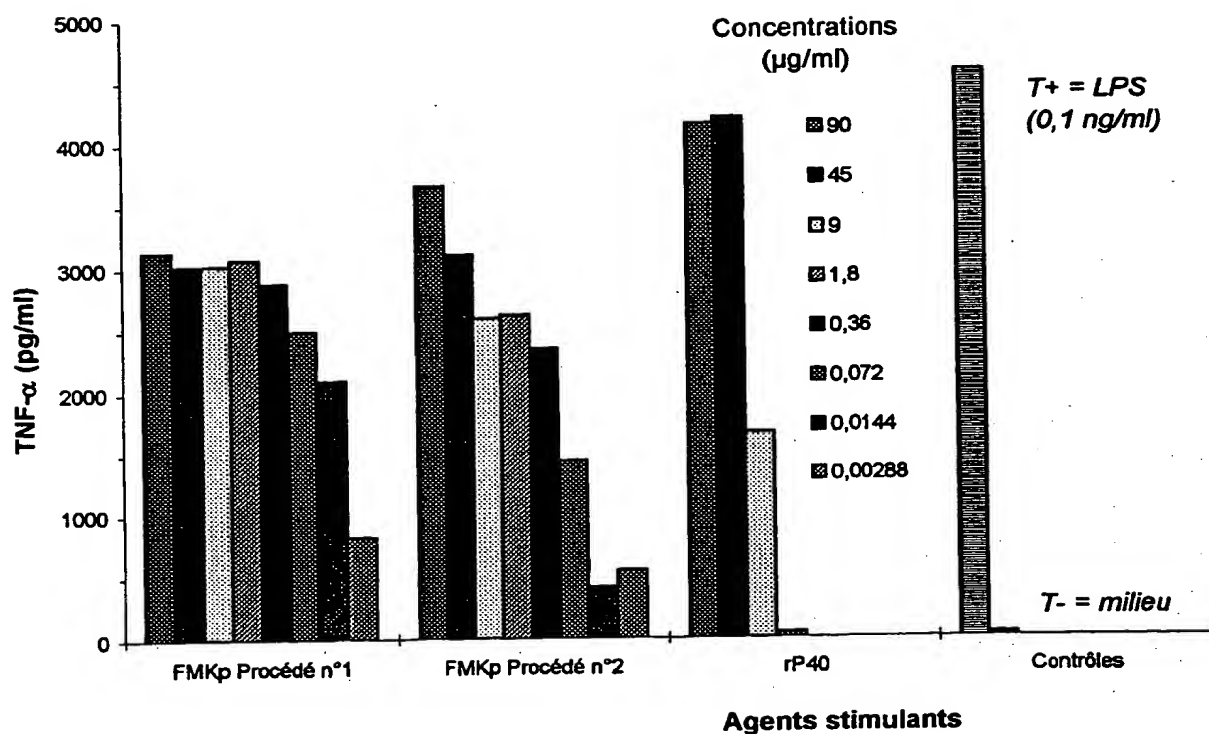
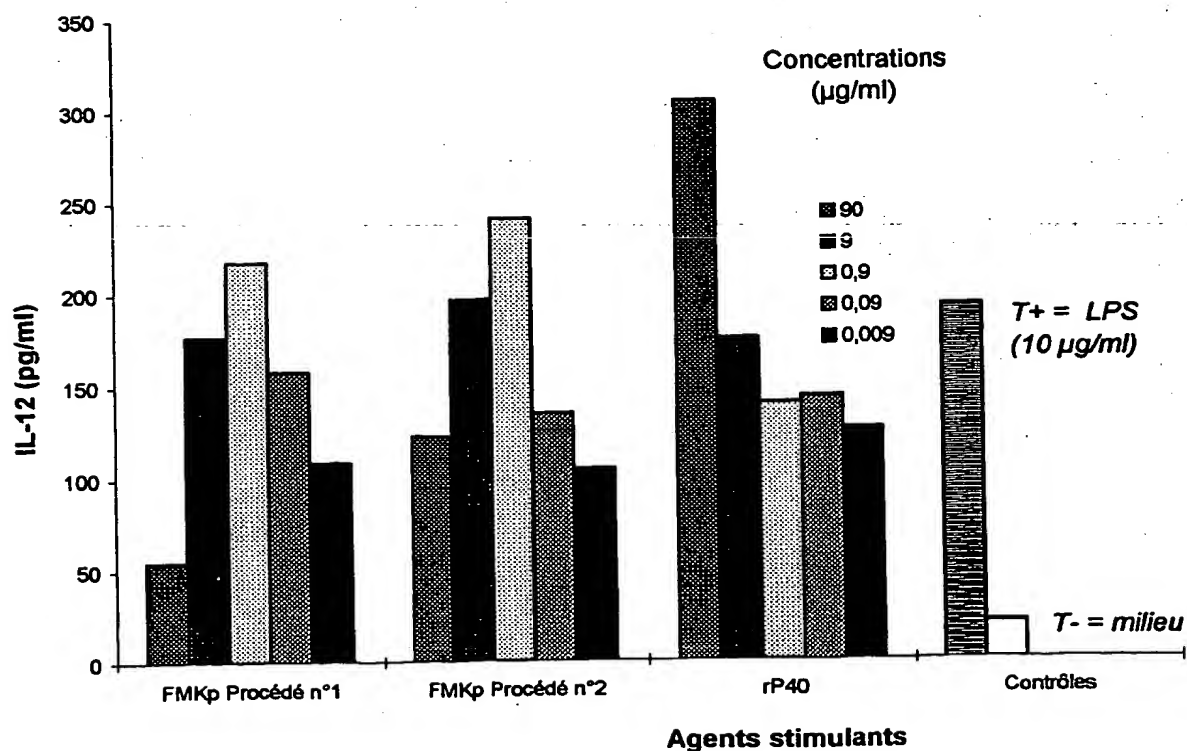


FIGURE 3



ORIGINAL

FIGURE 4

REVENDICATIONS

1/ Utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif pour la préparation d'une composition pharmaceutique immunostimulante capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale.

2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la fraction membranaire comprend une fraction membranaire de *Klebsiella pneumoniae*.

3/ Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la fraction membranaire comprend au moins des fractions membranaires de deux souches différentes de bactéries.

4/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction ;
- d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéasiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- f) ultrasonication du culot obtenu à l'étape e).

5/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une décongélation et du séchage des cellules ;

- c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du
5 culot ;
- f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et
- g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).
- 10 6/ Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que la fraction membranaire est la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* de séquence SEQ ID N° 2, ou l'un de ses fragments.
- 7/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de véhiculer
15 ladite fraction membranaire sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son activité immunostimulante et/ou sa capacité d'induire une réponse immunitaire antitumorale.
- 8/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit agent est de type émulsion huile dans eau ou eau dans huile.
- 20 9/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit agent est sous la forme d'une particule de type liposome, microsphère, nanosphère ou tout type de structure permettant l'encapsulation et la présentation sous forme particulière de ladite fraction membranaire.
- 10/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que
25 la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires.
- 11/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire
30 antitumorale desdites fractions membranaires est une cytokine.

12/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est un agent de régulation choisi parmi les hormones.

5 13/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est un agent de régulation choisi parmi les facteurs de croissance.

10 14/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est un composé cellulaire.

15/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est un acide nucléique choisi parmi les ADN et les ARN.

15 16/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est un composé de la famille des ribosomes.

17/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est une protéine de la famille des protéines de choc thermique.

20 18/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 17 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée en association avec un traitement anticancéreux.

19/ Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que le traitement anticancéreux est une chimiothérapie et/ou une radiothérapie.

25 20/ Utilisation selon l'une des revendications 18 à 19 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée simultanément, séparément ou étalée dans le temps avec le traitement anticancéreux.

21/ Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est administrée par voie entérale ou parentérale.

30 22/ Utilisation selon l'une des revendications 18 à 21, caractérisée en ce que ledit traitement anticancéreux associé est un traitement chimiothérapeutique comprenant un inhibiteur de protéases ou un composé à activité anti-angiogénique.

23/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 22, pour la prévention et/ou le traitement des cancers.

24/ Utilisation selon la revendication 23, pour la prévention et/ou le traitement des cancers de la vessie, de la prostate, du colon, du foie et des mélanomes malins.

25/ Procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- 10 b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction ;
- 15 d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéasiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- f) ultrasonication du culot obtenu à l'étape e).

20 26/ Procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une décongélation et du séchage des cellules ;
- 25 c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du
- 30 culot ;

f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et

g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).

5 27/ Procédé selon la revendication 25 ou 26, caractérisé en ce que ladite bactérie à gram négatif est *Klebsiella pneumoniae*.

 28/ Fraction membranaire susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des revendications 25 à 27.

10 29/ Composition pharmaceutique comprenant une fraction membranaire selon la revendication 28.

 30/ Composition pharmaceutique comprenant une fraction membranaire de bactérie gram négatif, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, ou composition pharmaceutique selon la revendication 29, caractérisée en ce qu'elle est associée à un traitement anticancéreux par chimiothérapie et/ou par radiothérapie.

15 31/ Composition pharmaceutique selon la revendication 30, caractérisée en ce qu'elle contient un composé anticancéreux comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

 32/ Composition pharmaceutique selon la revendication 30, caractérisée en ce que ledit composé anticancéreux est choisi parmi les inhibiteurs de protéases ou
20 parmi les composés présentant une activité anti-angiogénique.